

УДК 577.151

## БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ БЕНЗАЛЬДЕГИДА

Ф.К. Мухитова, Е.В. Каширина

(Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН А/Я 30, Казань 420111, Россия;  
e-mail: mukhitova@mail.knc.ru)

**Изучены некоторые биокаталитические свойства сульфатредуцирующей бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* штамм В-1388. Показано, что в анаэробных условиях в присутствии молекулярного водорода экстракты клеток *D. desulfuricans* катализируют трансформацию бензальдегида в бензиловый спирт и бензойную кислоту. Исследовано влияние физико-химических параметров (рН и ионная сила среды, температура, концентрации реагентов) на выход продуктов реакции. Определены оптимальные условия проведения реакции.**

Получение ферментов и их использование в различных технологических областях является сегодня одной из актуальных проблем биотехнологии. Наличие широкого спектра активных ферментов у сульфатредуцирующих бактерий позволяет использовать культуры сульфатредукторов, а также их клеточные экстракты в самых разнообразных процессах. В литературе имеется не так много сведений о возможности использования сульфатредуцирующих бактерий в восстановительных процессах [1, 2], особенно с участием молекулярного водорода [3].

Цель настоящей работы состояла в выяснении возможности восстановления бензальдегида молекулярным водородом при катализе экстрактами клеток *Desulfovibrio desulfuricans* штамм В-1388.

### Материалы и методы

В работе использовали сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* штамм В-1388, коллекция ВКМ (или *Desulfovibrio desulfuricans* 2198, коллекция института микробиологии РАН). Бактерии выращивали на среде Постгейта В. Клетки собирали в стационарной фазе роста. Для приготовления биокатализатора отмытые клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т при частоте 22 кГц (1 мин/мл) и центрифугировали при 15000g 50 мин, в экспериментах использовали супернатантную фракцию. Содержание белка в экстракте определяли по

модифицированному методу Лоури. Водород хроматографической чистоты получали с помощью генератора водорода типа СГС-2.

Реакцию трансформации бензальдегида проводили в пенициллиновых флаконах (объем около 15 мл), куда вносили по 3 мл раствора бензальдегида в 0,05 М буфере трис-НСI с заданным значением рН. Флаконы герметично закрывали, заполняли смесью водорода с аргонном нужного состава, либо чистым водородом. Реакцию начинали с введения экстракта клеток (2–5 мг белка). Флаконы встряхивали в течение 2 ч.

Продукты реакции анализировали на хроматографе “Кристаллюкс-4000” с управляющим и обрабатывающим пакетом программ *Net Chrom V 1,5* методом газожидкостной хроматографии. Кислородсодержащие продукты (бензиловый спирт, бензойная кислота) разделяли на колонке из нержавеющей стали ( $l = 150$  см, внутренний диаметр 3 мм, 10% *Reoplex-400*).

Температуру термостата программировали: 130° в течение 5 мин, повышение до 190° со скоростью 20°/мин, выдержка в течение 5 мин, повышение до 210° со скоростью 20°/мин.

Детектор пламенно-ионизационный. Температура испарителя 250°. Газ-носитель – азот (“ос.ч.”), 30 мл/мин.

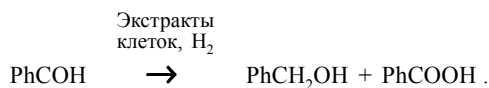
### Результаты исследований и обсуждение

Химическое восстановление альдегидов в спирты, особенно в больших масштабах, осуществляется путем

каталитического гидрирования. Реакции проводят в условиях повышенного давления (70 ат, 50°) на никелевых, палладиевых или платиновых катализаторах, промотированных двухвалентным железом. При восстановлении бензальдегида образуется бензиловый спирт (фенилкарбинол), который так же, как и получаемые на его основе эфиры, является душистым веществом, поэтому широко применяется в парфюмерии, является компонентом пищевых эссенций, спазмолитических, косметических, противоожоговых средств и т.д. Поиск более экономичного способа получения такого практически значимого соединения представляет большой интерес.

Ферментные системы, как правило, функционируют в водных средах и чувствительны к влиянию различных внешних факторов, таких как температура, рН среды, концентрация реагентов и т.д. Мы изучали возможность восстановления бензальдегида молекулярным водородом при катализе экстрактами клеток *D. desulfuricans* штамм В-1388, а также влияние различных условий на эффективность реакции.

Реакцию проводили в анаэробных условиях в атмосфере молекулярного водорода. В качестве контроля служили опыты без внесения клеточных экстрактов или с инертным газом (аргоном) в газовой фазе. Мы показали, что в атмосфере молекулярного водорода экстракты клеток *D. desulfuricans* катализируют трансформацию бензальдегида в бензиловый спирт и бензойную кислоту:



При замене водорода в газовой фазе на аргон бензиловый спирт не образуется, но увеличивается количество бензойной кислоты (таблица). Если в качестве восстановителя вместо водорода использовать дитионит натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ), то бензиловый спирт образуется, хотя и в меньшем количестве. Этот процесс не связан,

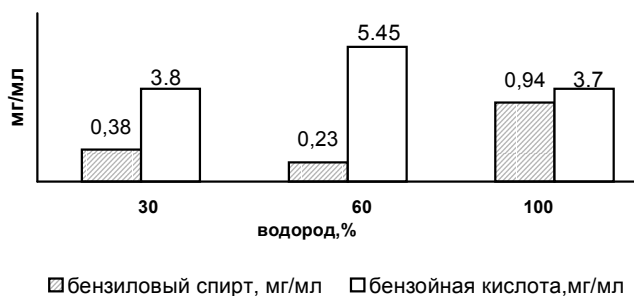


Рис. 1. Влияние концентрации водорода на выход бензилового спирта

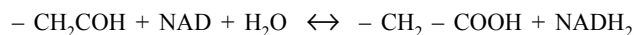
### Трансформация бензальдегида экстрактами клеток *Desulfovibrio desulfuricans* шт.В-1388

Вариант опыта	Бензиловый спирт, мг/мл	Бензойная кислота, мг/мл
100% H <sub>2</sub>	2,5	5,4
100% Ar	0	7,7
0,01 г дитионита натрия, 100% Ar	1,7	0,5

по-видимому, с участием гидрогеназы, так как молекулярный водород в реакционной смеси отсутствует.

Образование бензойной кислоты можно объяснить действием альдегиддегидрогеназы, которая, как известно [4], катализирует реакции окисления альдегидной группы в карбоксильную:

альдегиддегидрогеназа



Было установлено [5], что у сульфатредуцирующих бактерий имеются альдегиддегидрогеназы. Однако в данной работе мы не ставили целью изучение участия этого фермента в трансформации бензальдегида.

Известно, что концентрация субстрата оказывает влияние на скорость ферментативной реакции при постоянной концентрации фермента, и определение концентрации молекулярного водорода, при которой выход бензилового спирта наибольший, имеет значение для увеличения эффективности процесса. Мы определили выходы продуктов реакции восстановления бензальдегида при трех разных значениях концентрации водорода (30, 60 и 100%). При 100%-м содержании водорода в газовой фазе выход продукта восстановления наибольший. Полученные результаты представлены на рис.1.

Влияние рН реакционной среды изучали на примере буфера трис-НСl. Был выбран небольшой интервал рН (слабо-кислая, нейтральная и слабо-щелочная среда). Результаты опыта приведены на рис. 2,

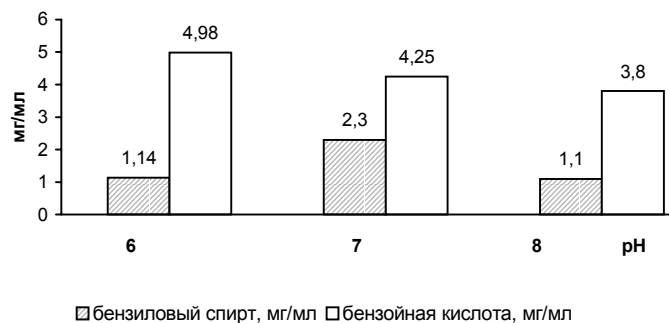


Рис. 2. Влияние рН на выход бензилового спирта

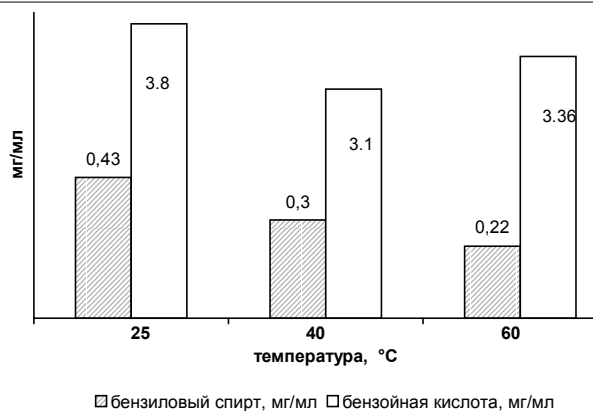


Рис. 3. Влияние температуры на выход бензилового спирта

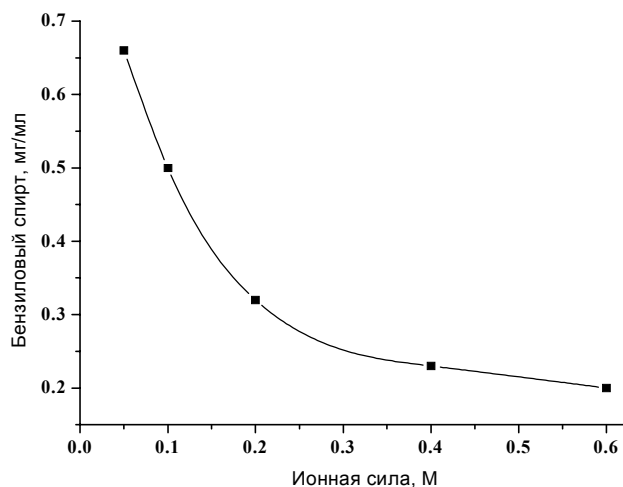


Рис.4. Влияние ионной силы на выход бензилового спирта

где показано что, наибольший выход бензилового спирта достигается при рН 7,0.

На рис. 3 представлена зависимость выхода бензилового спирта от температуры реакционной смеси. Как известно, оптимальная температура ферментативной реакции зависит от соотношения влияния температуры на скорость ферментативной реакции и скорость деструкции фермента. Для изучения влияния температуры на выход бензилового спирта реакцию восстановления бензальдегида проводили при 25, 40 и 60°. Наибольшее количество бензилового спирта образуется при 25°.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Boopathy R., Manning J.F.* // Can. J. Microbiol. 1996. **42**. P. 1203.
2. *Meckenstock R.U., Annweiler E.* // Appl. Environ. Microbiol. 2000. **66**. P. 2743.
3. *Мухитова Ф.К., Кияшко С.В., Ланидус А.Л.* // Прикл. биохим. микробиол. 1999. **35**. С. 308.
4. *Готшалк Г.* Метаболизм бактерий. М., 1982.
5. *Zellner G., Jargon A.* // Arch. Microbiol. 1997. **168**. P. 480.

Наличие в водном растворе разных ионов обуславливает их электростатическое взаимодействие друг с другом, характеризующееся ионной силой раствора, которое может быть выражено следующим образом:

$$M = 1/2 \sum C \times Z^2,$$

где  $M$  – ионная сила раствора;  $C$  – концентрация иона;  $Z$  – заряд иона.

Для раствора одной соли с однозарядными ионами ионная сила фактически равна молярной концентрации раствора. Фермент, как и любой белок, имеет большое число ионных групп, способных электростатически взаимодействовать с ионами в растворе, следовательно изменение состояния ионных групп в ферменте оказывает влияние на активность фермента, особенно это касается групп, участвующих в катализе или связывании субстрата. Поэтому изменение ионной силы раствора, в котором происходит ферментативная реакция, должно влиять на эффективность процесса.

Нами изучено влияние величины ионной силы раствора на выход бензилового спирта в реакции. Результаты приведены на рис. 4, где показано, чем меньше ионная сила в растворе, тем выше эффективность образования бензилового спирта.

Таким образом, наиболее оптимальными условиями для синтеза бензилового спирта в реакции восстановления бензальдегида молекулярным водородом являются следующие: трис-НСl буфер (0,05 М); рН 7,0;  $T = 25^\circ$ , 100%  $H_2$ .

В реакции трансформации бензальдегида могут принимать участие, как минимум, два фермента: гидрогеназа и альдегиддегидрогеназа. Соотношение количества бензилового спирта и бензойной кислоты в продуктах ферментативной трансформации бензальдегида зависит от соотношения значений активности, по крайней мере, этих двух ферментов.

Изучение механизма трансформации бензальдегида сульфатредуцирующими бактериями и регулирование этого процесса могут составить задачу дальнейших исследований.